

Tsitrullineeritud peptiidi vastased antikehad reumatoidartriidi diagnostikas

Mare Suigom –TÜ ÜMPI õppetool

reumatoidartriit, diagnostilised probleemid, tsitrulliin

Reumatoidartriit on krooniline süsteemne põletikuline haigus, mis haarab peamiselt liigeseid ja võib viia nende destruktioonini. Haiguse seroloogiline diagnostika on siiani olnud piiratud ja mittespetsiifiline. Kuna nüüdisaegse reumatoidartriidi ravi põhimõtteks on võimalikult varajane agressiivne ravi haiguse algstaadiumis, siis on suure spetsiifilisusega diagnostiliste testide kasutuselevõtt väga vajalik. Artiklis on käsitletud tsüklilise tsitrullineeritud peptiidi vastaste antikehade olemust, määramise metoodikat ning nende tähtsust reumatoidartriidi seroloogilises diagnostikas ja haiguse kulu hindamisel.

Reumatoidartriidi diagnostilised probleemid

Reumatoidartriit (RA) on krooniline põletikuline liigesehaigus. See on üks sagedasemaid autoimmuunhaigusi, mis haarab 1–3% maailma rahvastikut (1) ja on üks paljudest autoimmuunhaigustest, mis esineb naistel sagedamini kui meestel (sagedusega 2 : 1 kuni 4 : 1). RA juhud on erineva geneetilise taustaga ning heterogeensed haiguse kliinilise pildi ja ravile reageerimise osas (2).

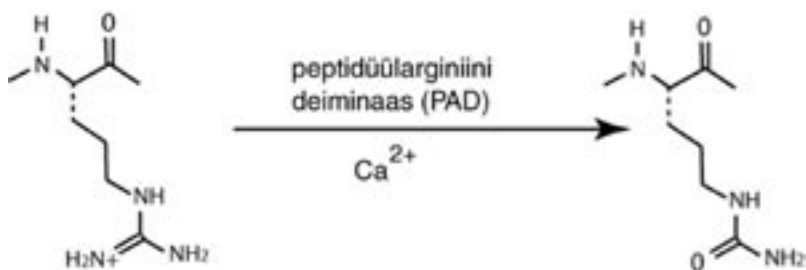
Reumatoidartriiti iseloomustab sünoviaalmembraani põletik, mis levib sümmeetriliselt väikestelt liigestelt suurematele. Haiguse kriteeriumiteks on *American College of Rheumatology* (ACR) järgi hommikune liigeste jäikus kestusega vähemalt 1 tund, kolme või enama liigesepinna artriit, käe või sõrmeliigeste artriit, sümmeetriline artriit, reumatoidsõlmed, positiivne reumatoidfaktor (RF), käte tüüpilised röntgenmuutused.

Patsiendil on RA, kui neist 7 kriteeriumist on täidetud 4. Esimesed neli kriteeriumit peavad esinema vähemalt 6 nädala jooksul (3). Haigus kulgeb progresseeruvalt ja võib viia liigeste destruktiooni ja patsiendi invaliidistumiseni, mistõttu on väga oluline võimalikult varajane diagnoos ja ravi, vältimaks liigesekahjustuste teket.

Reumatoidartriidi diagnoos põhineb peamiselt kliinilisel pildil. Paljude varase RA juhtude puhul võivad kliinilised sümptomid olla tagasihoidlikud

või mittespetsiifilised ja haiguse kliiniline pilt ei täida ACR esitatud RA diagnostilisi kriteeriume (4). Siiani on RA seroloogiline diagnostika olnud piiratud võimalustega ja põhinenud RF olemasolul. Reumatoidfaktoriks on antikehad (IgM, IgG, IgA klassist), mis reageerivad γ -globuliini Fc fragmendiga. Laborites turbidimeetriliselt, nefelomeetriliselt ja lateksaglutinatsioonitestiga peamiselt määratavate IgM-tüüpi antikehade test on positiivne 60–80%-l RA juhtudest (5). IgG ja IgA RF isotüüpe saab kindlaks teha ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) ning RIA meetodiga (*radioimmunoassay*). Kui kasutatakse IgM ja IgA RF kombineeritud määramist, siis on nende antikehade nivoo tõus väga spetsiifiline RA-le, esinedes harva teiste reumaatiliste haiguste korral. IgA RF, mis korreleerub paremini RA aktiivsuse ja ekstraartikulaarsete kliiniliste nähtudega, ei ole siiani leidnud laialdast kasutamist (2). IgM RF, mida on RA seroloogilises diagnostikas siiani kõige enam kasutatud, on tundlik, kuid mittespetsiifiline RA marker, mis võib esineda ka tervetel inimestel ja infektsioonide korral, samuti teiste autoimmuunhaiguste puhul (SLE, Sjögreni sündroom, sklerodermia jt) (5).

Viimastel aastatel on tuvastatud erinevaid märkeid, et parandada RA seroloogilise diagnostika tundlikkust ja spetsiifilisust. Seejuures on tsüklilise tsitrullineeritud peptiidi (CCP) vastased antikehad osutunud üheks spetsiifilisemaks markeriks RA diagnostikas.



Joonis 1. Peptidüülarginiini ensümaatiline konversioon peptidüül-tsitrulliiniks.

Mis on tsitrullineeritud peptiid?

Tsitrulliin on mittestandardne aminohape, mis tekib arginiini jääkidest paljudes valkudes peptidüülarginiini deiminaasi (PAD) toimel (vt jn 1).

Sellel ensüümil on mitmeid isotüüpe: põletikulisel sünooviumis on RA puhul külluslikult PAD 2 ja PAD 4. Need ensüümid põhjustavad sünooviumi proteiinide (nagu fibriin) tsitrullineerituse. RA puhul võib tsitrullineeritud ekstratsellulaarne fibriin sünooviumis olla üks põhilisematest autoantigeenidest, mis viib lokaalse immuunvastuse tekkeni, seda tsitrullineeritud peptiidi vastaste antikehade ja tsitrullineeritud filagriini vastaste antikehade lokaalse produktsiooni kaudu liigeses (4).

Aastal 1998 avaldas Schelleken koos oma kolleegidega artikli tsitrulliini sisaldava sünteetilise peptiidiga reageerivatest autoantikehadest, mida leiti 76%-l RAD põdevatest haigetest. Need antikehad, mis esinesid RAD põdevate patsientide seerumis ja mis tundsid ära tsitrulliini sisaldava epitoobi, olid väga afiinsed ja peamiselt IgG klassist ning nende spetsiifilisus RA puhul oli 96% (6).

Määramise meetodikast

Aastal 2000 avaldas Schelleken artikli tsüklilise tsitrullineeritud valgu (CCP) kasutamisest antigeenina ELISA-testis. Test tagas inimese IgG-klassi kuuluvate tsüklilise tsitrullineeritud peptiidi vastaste autoantikehade määramise, mis osutus tundlikuks ja väga spetsiifiliseks seroloogiliseks analüüsiks RA diagnostikas (7).

Tundlikkuse suurendamiseks võeti kasutusele kombinatsioon üheksast erinevast tsitrullineeritud peptiidi variandist (8). Testi tulemused paranesid ja lihtsustusid, kui antigeeniks olev lineaarne peptiid asendati tsüklilise peptiidiga, mis on kolme-dimensionaalse struktuuriga ja mille tunnevad ära autoantikehade heterogeensed populatsioonid (8).

Kliiniline tähendus

Aastal 2000 korraldas firma EUROIMMUN GmbH (Lübeck, Saksamaa) uuringu, kus analüüsiti 1151 RAD põdeva patsiendi seerumeid, mis olid pärit 8 erinevast keskusest üle maailma. Kontrollgrupiks oli 1388 seerumit veredoonoritelt ja patsientidelt, kellel esinesid teised haigused. Uurigu eesmärgiks oli hinnata CCP-vastaste antikehade testi tundlikkust ja spetsiifilisust RA puhul.

ELISA-testi tulemusena saadi vastavate antikehade tundlikkus 80% ja RA spetsiifilisus 97% (5) (vt tabel 1).

Analoogilise uuringu on teinud Inglismaal uuringurühm Axis-Shield: määrati CCP-vastased antikehad (IgG tüüpi) 180 inimesel kontrollrühmast, milles oli 92 tervet inimest, 42 erinevate sidekoe-haigustega patsienti ja 48 muude haigustega patsienti. Haigete grupis oli 92 RAD põdevat patsienti. Tulemuseks saadi CCP-vastaste antikehade spetsiifilisus 97,8% ja tundlikkus 88%. RA rühmas saadi RF testi tundlikkuseks 64,5%. Korrelatsioon RF ja CCP vastaste antikehade testi tulemuste vahel oli

Tabel 1. CCP-vastaste antikehade tundlikkuse ja spetsiifilisuse uuring

Uuritud isikud	Anti-CCP ELISA	
	Uuritute hulk	Positiivne reaktsioon (%)
Äsja diagnoositud RA	455	79
RA >2 aasta	696	80
Tundlikkus RA puhul	1151	80
Teised artropaatiad	370	6
SLE	357	8
Sjögreni sündroom	121	3
Skleroderma	125	5
Polümüüosiit/dermatomüosiit	61	0
Fibromüalgia	31	3
Wegeneri granulomatoos	12	0
Crohni tõbi	40	0
Haavandiline koliit	40	3
Autoimmuunse türeoidiit	50	0
Borrelioos	45	2
Veredoonorid	376	0
Spetsiifilisus RA puhul	1764	97

74% ning 23 patsiendi seerumid olid RF-negatiivsed ja anti-CCP-positiivsed (9).

Samal eesmärgil korraldasid 2000. aastal Itaalia immunoloogid ja reumatoloogid uuringu, kus analüüsiti 330 seerumit CCP-vastaste antikehade suhtes. Neist 330st oli 98 seerumit RAD põdevatelt patsientidelt ja 232 kontrollseerumit, kuhu kuulusid erinevate diagnoosidega patsiendid. Igas seerumis määrati ka RF ja hinnati nende kahe analüüsi tundlikkust ning RA spetsiifilisust. CCP-vastaste antikehade tundlikkuseks saadi 50% ja RA spetsiifilisus oli 97,8% ning RF tundlikkus oli 62% ja spetsiifilisus 84% (10).

Firma EUROIMMUN GmbH on uurinud ka CCP-vastaste antikehade korrelatsiooni RF IgM-ga. Selles uuringus kasutati 196 seerumit veredoonoritelt ja 504 seerumit kindla RA-diagnoosiga patsientidelt (vt tabel 2).

Saadud tulemused näitasid, et CCP-vastased antikehad on reumatoidartriidi puhul spetsiifilisemad kui RF, millest järeldub, et nende kahe analüüsi kombineerimine on RA diagnostikas oluliseks abivahendiks.

Väga oluline on fakt, et CCP-vastaseid antikehi on võimalik kindlaks teha RA varases

Tabel 2. CCP-vastaste antikehade korrelatsioon RF IgM-ga

Asümptomaatilised doonorid (n = 196)	RF IgM ELISA	
	Positiivsed	Negatiivsed
Anti-CCP ELISA positiivsed	0	0
negatiivsed	37	159
RA (n = 504)	RF IgM ELISA	
	Positiivsed	Negatiivsed
Anti-CCP ELISA positiivsed	365	33
negatiivsed	48	58

staadiumis, samuti aastaid enne RA avaldumist (uuringute alusel 1,5–9 aastat varem) ning nende tase tõusis haiguse avaldudes (11). Mitme kliinilise uuringu alusel on täheldatud, et CCP-vastased antikehad on prognostilise väärtusega, sest nende antikehadega RA-patsientidel esineb erosiivseid kahjustusi rohkem kui patsientidel, kellel CCP-vastased antikehad puuduvad (12).

Üheks näiteks on Prantsuse reumatoloogide ja immunoloogide tehtud uuring, kus hinnati tsükliilise tsitrullineeritud peptiidi vastaste antikehade seost erosiivse kahjustusega. Uuriti 191 RAD põdevat patsienti, kellel oli RA diagnoositud viimase aasta jooksul, ja jälgiti neid patsiente viie aasta lõikes. Enne haigust modifitseeriva ravi (HMR) alustamist uuriti 145 patsiendi seerumeid CCP-vastaste antikehade suhtes ELISA-meetodiga ning tehti röntgeniülevõtted labakätest ja -jalgadest. Uuritud patsientidest oli CCP-vastaste antikehade test positiivne 58,9%-l. Viie aasta möödudes oli anti-CCP-positiivsetel patsientidel välja kujunenud märkimisväärselt rohkem erosiivseid kahjustusi (Sharpi skoori järgi) kui anti-CCP-negatiivsetel patsientidel (13). Erosiivse haiguskulu puhul omistatakse CCP-vastastele antikehadele suuremat tähtsust kui IgM RFile. On leitud, et CCP-vastaste antikehade määramine on oluline, otsustamaks, kas patsient vajab haiguse alguses agressiivsemat ravi või mitte (4). Vastavate antikehade erinevad terapeutilised võimalused on uurimisel. Kõige parema prognostilise markeri moodustavad CCP-vastased antikehad kombinatsioonis RFile.

Eestis hakati CCP-vastaseid antikehi esimest korda määrama Põhja-Eesti Regionaalhaigla (PERH) immunoloogia laboris koostöös sama haigla reumatoloogidega ja Ida-Tallinna Keskhaigla (ITKH) Magdaleena korpuse reumatoloogidega alates 2003. aasta kevadest.

Senised analüüsid on kinnitanud CCP-vastaste antikehade head korreleerumist RAga. Enam kui 2/3-l RAD põdevatest patsientidest osutus CCP-vastaste antikehade test positiivseks. On märkimisväärne, et osa seronegatiivsete (RF-negatiivsete) RA juhtude korral esines CCP-vastased antikehi.

Eestis CCP-vastaste antikehade määramist alustanud reumatoloogide ja laboriarstide sõnul on see test olnud suureks abiks just varajase RA diagnoosimisel, eriti juhul kui patsientide kaebused ja haiguse kliiniline pilt ei täida RA diagnostilisi kriteeriume.

Nüüdseks on CCP-vastaseid antikehi võimalik määrata Tallinnas PERH immunoloogia laboris, ITKH laboris ja lähiajal ka TÜ Kliinikumi ühendlaboris.

Kokkuvõte

CCP-vastaseid antikehi produtseeritakse lokaalselt RAD põdevate patsientide põletikulises sünooviumis (4). Nende antikehade testi tundlikkus RA puhul on 50% ja spetsiifilisus 97,8% (10). CCP-vastaste antikehade positiivsus varase ja väljakujunenud RA puhul peegeldab erosiivsemat haiguse vormi (12), mistõttu on ilmne, et CCP-vastaste antikehade määramine ELISA-testiga aitab reumatoloogidel paremini diagnoosida reumatoidartriiti, prognoosida haiguse kulgu ning vastavalt sellele paremini otsustada baasravimi valiku üle.

Tänuavaldus. Avaldan tänu selle artikli kirjutamisel osutatud abi eest dr Meeli Glükmannile, dr Ilse Rinnele ja dr Aili Lilleorule PERH immunoloogia laborist ning sama haigla reumatoloogidele, samuti oma juhendajale immunoloogiaprofessor Raivo Uibole.

Kirjandus

1. Parslow TG, Stites DP, Terr IA, Imboden JB. Medical Immunology. Mc Grow-Hill Companies; 2001.
2. Nakamura RM. Progress in use of biochemical and biological markers for evaluation of rheumatoid arthritis. J Clin Lab Anal 2000;14:305-13.
3. Gerd H. Innere Medizin. Köln; 1999.
4. Abstracts of the American College of Rheumatology 67th Annual meeting and the Association of Rheumatology Health Professionals 38th annual meeting: the use of anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) antibodies in RA. Florida, USA 2003; Arthritis Rheum 2003;48.
5. Euroimmun: Medizinische Labordiagnostika GmbH (Laboratorium für Experimentelle Immunologie). Antibodies against cyclic citrullinated peptide (CCP) (IgG). Instructions for using the ELISA test. Version 08 / 02.
6. Schellekens GA, de Jong BA, van Venrooij WJ, van de Putte LB, van den Hoogen FH. Citrullin is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis specific autoantibodies. J Clin Invest 1998;101:237-81.
7. Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. Arthritis Rheum 2000;43:155-63.
8. van Boekel M, Vossenaar ER, van den Hoogen HJ, Venrooij WJ. Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. Arthritis Res 2002;4:87-93.
9. Vasishta A, Axis-Shield UK. Diagnosing early-onset rheumatoid arthritis: the role of anti-CCP antibodies. Am Clin Lab 2002;21:34-6.

10. Bizzaro N, Mozzanti G, Tonutti E, Villalta D, Tozzoli R. Diagnostic accuracy of the anticitrulline antibody assay for rheumatoid arthritis. *Clin Chem* 2001;47:1089–93.
11. Rantapää-Dahlqvist S, de Jong BA, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H, et al. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:2741–9.
12. Kroot EJ, de Jong BA, van Leenwen MA, Swinkels H, van den Hoogen FH, van't Hof M. The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:1831–5.
13. Meyer OC, Nakaise-Roland P, Dpugadas M, Goupille P, Contagrel A, Dubois A. Antifilaggrin and anticitrullinated cyclic peptide antibody assay in early rheumatoid arthritis predicting 5-year radiographic damage. Annual European Congress of Rheumatology 2002, Stockholm. The EULAR Journal 2002;61.

Summary

Cyclic citrullinated peptide antibodies in rheumatoid arthritis

Rheumatoid arthritis (RA) is the most common autoimmune rheumatic disease. It is characterized by inflammation of the synovial membrane of the diarthroidal joints. The diagnosis of RA is primarily based on clinical symptoms. Serological diagnosis has been limited. The rheumatoid factor (RF), which is the most frequently tested serological marker, is not very specific for RA. Recently a new serological test, the anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) was developed and it has excellent specificity for the diagnosis of RA, especially in patients with early disease. Using several citrulline-containing peptide variants in ELISA, autoantibodies could be detected in 76% of RA sera with a specificity of 97%. Citrulline is an unusual amino acid resulting from an enzymatically posttranslationally modi-

fied arginine residue. Citrulline is present on a few human proteins and anti-CCP antibodies are locally generated in the inflamed joint. Local citrullination of extravascular proteins might be one of the initiating events leading to autoimmunity of RA. Several studies have shown that anti-CCP antibodies have significant prognostic utility in determining damage in early RA. Anti-CCP positive patients develop more severe damage in early RA, as detected by radiologic investigations, than patients who are anti-CCP negative. Thus these antibodies are very helpful in diagnosing early RA and in deciding whether the patient needs more aggressive therapy or not.

maresuigom@hotmail.ee